

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

POVIJESNI I AKTUALNI PREGLED KONCEPTA GENA
SEMINARSKI RAD

Frane Babarovi
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Kristian Vlahović

Zagreb, 2014.

SADRŽAJ

1. POVIJESNI PREGLED KONCEPTA GENA

1.1. Pregled koncepta gena 1860 – 1900-e	4.
1.2. Pregled koncepta gena: 1910-ih godina	5.
1.3. Pregled koncepta gena 1940-ih godina	6.
1.4. Pregled koncepta gena 1950-ih godina	7.
1.5. Pregled koncepta gena 1960-ih godinav.....	7.
1.6. Pregled koncepta gena 1970-ih – 1980-ih godina.....	8.
1.7. Pregled koncepta gena 1990-e – 2000-e	8.

2. POJMOVI KOJI KARAKTERIZIRAJU GENSKU AKTIVNOST

2.1. Regulacija aktivnosti gena	10.
2.2. Preklapanje	11.
2.3. Prikrajanje	11.
2.4. Trans – prikrajanje	12.

3. DOPRINOS ENCODE PROJEKTA DEFINIRANJU GENA

3.1. Transkripti koji prethodno nisu anotirani	13.
3.2. Neanotirani i alternativni TSS-ovi	14.
3.3. Raspodjela regulacijskih elemenata u genomu	14.
3.4. Pseudogeni	15.
3.5. Nekodirajuće RNA molekule	17.
3.6. Genski i intergenski: postoji li razlika?	18.

4. Zaključak

4.1. ENCODE definicija gena	19.
4.2. Zaključak i osobno viđenje problematike	19.

5. LITERATURA

6. SAŽETAK	22.
7. SUMMARY	22.

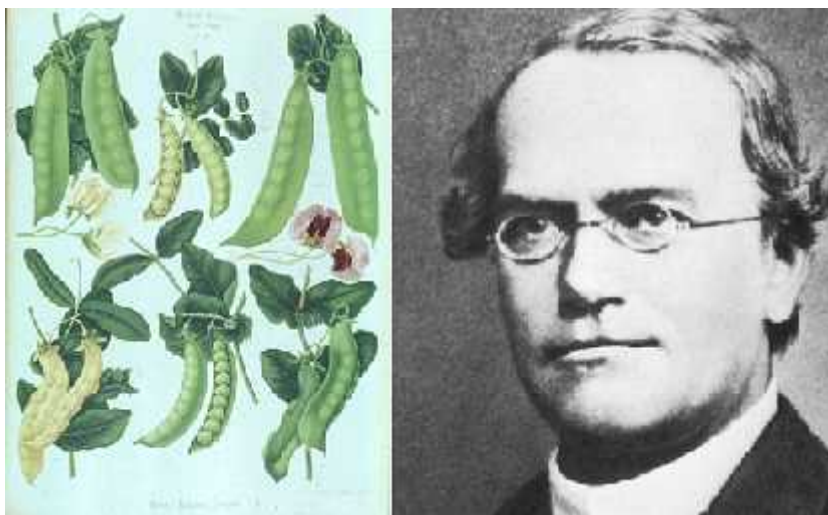
1. Povijesni pregled koncepta gena

1.1. Pregled koncepta gena 1860 – 1900-e

Koncept pojma gen se mijenjao i postajao sve kompleksniji od trenutka kada je prvi put predložen. Danas postoje mnoge definicije, iako se ve ina njih i dalje referira na pretpostavke postavljene u samom po etku istraživanja istog, odnosno da definicija gena u sebi sadrži determinaciju odre enog fenotipa organizma i mogu nost i karakteristike naslje ivanja datog fenotipa (Gerstein, 2007).

Koncept gena prvi je pretpostavio Gregor Mendel 1860-ih godina. Gregor Mendel nikada nije upotrijebio rije gen, ali je koristio pojmove poput *faktora* ili *elementa* kako bi obrazložio razloge nastanka i naslje ivanja razli itih fenotipskih karakteristika u potomcima. Mendel je eksperimentalno utvrdio da se tijekom križanja biljaka neka svojstva, poput visine biljke ili boje cvijeta (Sl. 1), u potomcima pojavljuju sa statisti kom to noš u i da su naslje ena poput odre enih entiteta iji fizi ki karakter, zbog eksperimentalne ograni enosti, nije mogao predvidjeti. Drugim rije ima, Mendel je samo predvidio pravilnost naslje ivanja odre enih faktora i injenicu da naslje ivanje fenotipskih svojstava ima fizi ku i mjerljivu pozadinu.

“Razli ite karakteristike dviju biljaka mogu jedino biti posljedica razlike postojanja i grupiranja elemenata koji intereagiraju u germinativnoj stanici.” (Mendel, 1866).



Slika 1. Gregor Mendel

Iako Mendelov rad nije imao snažan utjecaj na tadašnju znanstvenu zajednicu, gotovo 40 godina nakon njegovih istraživanja, tri znanstvenika (Hugo de Vries, Carl Correns i Erich von Tschermak) su revidirala Mendelova istraživanja i od zaborava izbacili njihove rezultate.

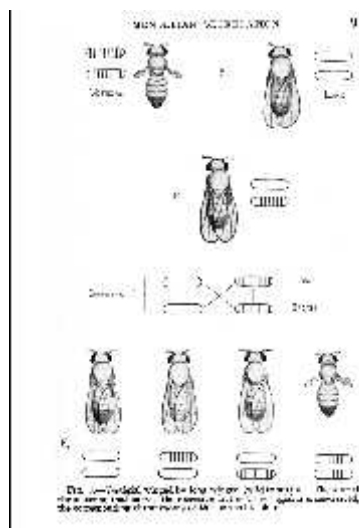
Pojam *gen* prvi je upotrijebio danski biolog Wilhelm Johannsen kako bi objasnio fizi ki entitet koji odre uje naslje ivanje odre enih karakteristika nekog organizma. On je objasnio da je iskoristio rije *gen* kao apstraktni pojam kako bi najlakše objasnio ekperimentalno predvi ena svojstva fizi kog entiteta, odnosno,

pojave u germinativnim stanicama. Njime se najbolje može objasniti biološki fenomen da su mnoge karakteristike organizma određene u germinativnim stanicama pomoću specifičnih uvjeta, odnosno determinanti koje se u njima pojavljuju na jedinstven i odvojen način.

Vidljivo je da je u ranim godinama svog postojanja gen egzistirao kao apstraktan koncept koji je u sebi sadržavao rezultate eksperimentalnih istraživanja, a kojim je utvrđeno njegovo postojanje i važnost u nasljeđivanju fenotipa. Zaključak koji bi iz današnje perspektive gledanja sumirao sva tadašnja naganja i evaluaciju pojma gena jest da je fenotip determiniran genotipom. (The Gene: A Needed Revolution; Craig Holdrege; A publication of The Nature Institute)

1.2. Pregled koncepta gena: 1910-ih godina

Sljedeći korak u razvoju koncepta gena uslijedio je istraživanjima Thomasa Morgana i njegovog laboratorija na segregaciji mutacija u organizmu *Drosophila melanogaster*. Svojim istraživanjima potkrijepili su Mendelova opažanja, ali su također mogli, s obzirom na napredak znanosti, (ponajprije “explaining Mendelian phenomenon by means of manoeuvres of the chromosomes”) ponuditi i mehanizme kojima se odvijaju predviđene jedinice nasljeđivanja. Koristeći mutante različitih fenotipa *Drosophila melanogaster* i istražujućih principe njihove segregacije iz generacije u generaciju križanih jedinki, Morgan i suradnici su ne samo potvrdili Mendelova naganja, već su ih i proširili. Istraživanja su se bazirala na međusobnoj povezanosti i određivanju međugenskih, ali i drugih utjecaja na segregaciju određenih gena, a samim time i svojstava do tada determiniranih gena unutar, kako su ih oni nazivali, Mendelovih regija (kod *Drosophila* su u vremenu pisanja citiranog rada postojale, primjerice, četiri Mendelove regije). Njihovi eksperimentalni podaci mogli su se objasniti modelom koji gene gleda kao entitete koji se nalaze na kromosomima, a koji se nasljeđuju zajedno u ovisnosti o njihovoj međusobnoj udaljenosti (Sl. 2; Morgan i suradnici, 1915).



Slika 2. Morganov prikaz segregacije promatranih fenotipskih svojstva, te vjerojatnost i kombinacije prilikom nasljeđivanja određenog svojstva.

U stalnoj fluktuaciji poimanja koncepta gena, ovo desetljeće predstavlja odmak od kasnijih nastojanja što to nijeg utvrđivanja položaja gena, te ostavljanja njegovog postojanja na apstraktnoj razini. Pojam apstraktna razina najkraće pojašnjava niz eksperimenata u kojima je gen jednostavno pretpostavljen kao lokus na kromosomima, a sve ostalo što se moglo zaključiti o njemu proizlazi iz njegova ponašanja naspram drugih gena tokom rekombinacije i mutacije.

U ovom periodu s karakterističnom znanstvenom tendencijom ka definiranju mehanizama, tj. potvrđivanja "Mendelova nasljeđivanja" gena, konačno potvrdu dala je Barbara McClintock koja donosi zaključak da sparni kromosomi koji su heteromorfni u dvima regijama izmjenjuju svoje dijelove u isto vrijeme kada izmjenjuju gene povezane s njima (McClintock, 1931).

1.3. Pregled koncepta gena 1940-ih godina

Definiciju pojma gen 1940-ih godina uvelike je okarakteriziralo istraživanje znanstvenika Georgea W. Beadle i Edwarda L. Tatum. Svoj su rad započeli na organizmu *Drosophila melanogaster*, a nakon što su uvidjeli veliku kompleksnost samog organizma, svoje istraživanje su nastavili na modelnom organizmu *Neurospora crassa* (http://www.genomenetwork.org/resources/timeline/1941_Beadle_Tatum.php).

Beadle i Tatum su rendgenskim zračenjem uzrokovali genetske mutacije, od kojih su neke onemogućile sporama *Neurospora crassa* da sintetiziraju određene nutrijente, a time i da rastu. Potom su u medij dodavali jedan po jedan suplement za koji su pretpostavljali da postoji mutacija te su time determinirali koji enzim nedostaje. Npr., Mutaciju gena koji odgovara za sintezu enzima u putu biosinteze vitamina B6 ustvrdili su dodavanjem i vitamina B6 u podlogu i detekcijom rasta spora s dodatkom sve veće koncentracije vitamina B6 (Sl. 3). Sparivanjem mutirane jedinke s normalnom jedinkom pokazali su da je metabolički defekt recesivno svojstvo, a time su dokazali alternaciju određene genove (Beadle i Tatum, 1941).

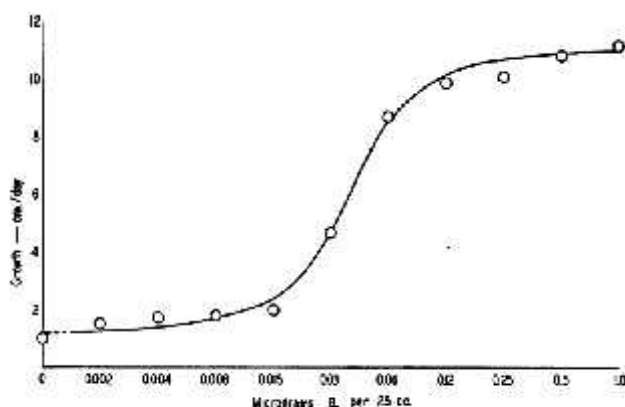


FIGURE 1
The relation between growth rate (cm./day) and vitamin B₆ concentration.

Slika 3. Ovisnost stupnja rasta jedinke o koncentraciji dostupnog vitamina B6

Misao vodilja njihova zajedničkog rada je ustvarenje povezanosti pojma gena i njihove funkcije, odnosno traženje poveznice između u samog gena i "genskog produkta". Konačna tvrdnja koja je postavljena tokom njihova rada i koja je svojedobno definirala pojam gena bila je da jedan gen odgovara za nastanak jednog enzima (Beadle i Tatum, 1941).

1.4. Pregled koncepta gena 1950-ih godina

Znanstvena težnja za identificiranjem kemijske i fizikalne osnove nasljeđivanja, odnosno determinacijom tipa molekule kojoj pripadaju geni, tekla je kroz nekoliko desetljeća a uz nekolicinu bitnih otkrića. 1926. godine, istraživanje mehanizma genetičkog nasljeđivanja došlo je do molekularne razine. Prethodna otkrića uputila su znanstvenike na kromosome koji se nalaze u jezgri. Ali potraga za tipom molekule kojem pripada genetski materijal još je uvijek bilo pitanje bez odgovora.

Hermann J. Muller je 1926. godine započeo s nizom eksperimenata koji su u konačnici dali ideju o utjecaju radioaktivnog zračenja na gene, odnosno potpomogli su Mulleru da pojedine gene shvati kao odvojene molekularne jedinice. 1928. godine Frederick Griffith je u prvim postavio eksperiment i doveo do otkrića procesa transformacije kod bakterija, no kemijska priroda materijala prenešenog tokom transformacije je ostala nepoznata sve do 1944. godine. Članak "*Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types*" Oswalda Theodorea Averya Jr. iz 1944. Godine (Sl. 4) doveo je do zaključka da se radi o deoksiribonukleinskoj kiselini. (Avery i suradnici, 1944.)

3. The data obtained by chemical, enzymatic, and serological analyses together with the results of preliminary studies by electrophoresis, ultracentrifugation, and ultraviolet spectroscopy indicate that, within the limits of the methods, the active fraction contains no demonstrable protein, unbound lipid, or serologically reactive polysaccharide and consists principally, if not solely, of a highly polymerized, viscous form of desoxyribonucleic acid.

Slika 4. Dio zaključka iz originalnog rada Oswalda Theodorea Averya (Avery i suradnici, 1944.)

1.5. Pregled koncepta gena 1960-ih godina

Nekolicina je eksperimenata i zaključaka pridonijela shvaćanju gena kao koda koji se nalazi na nukleinskoj kiselini, a u konačnici daje funkcionalan produkt; 1953. godine James D. Watson i Francis D. Crick pridonijeli su razjašnjenju načina na koji DNA funkcionira kao molekula nasljeđivanja rješavanjem trodimenzionalne strukture DNA (<http://www.thehistoryblog.com/archives/25193>). Važno otkriće bilo je i dešifriranje genetičkog koda. Iako se ova otkrića nisu direktno ticala pojma gena, svakako su pomogla u smještanju gena, kako mehanicistički, tako i konceptualno u prirodu života. Doprinos problematiziranju koncepta gena svakako ima i Francis Crick koji u svome radu "*On Protein Synthesis*" iznosi pregled dotadašnjeg znanja o genima, produktima gena te protoku informacija u ekspresiji gena iz nukleinske kiseline do proteina. To se smatra početkom sagledavanja pojma *centralne biološke*

dogme. Centralna biološka dogma sagledava protok geneti ke informacije od molekule DNA do proteina (Sl. 5).



Slika 5. Centralna biološka dogma. (Koonin E.V., 2012.)

Me utim, bez obzira na brojna nova otkri a koja su osvijetlila pravu biološku ulogu i definiciju gena, postojali su odre eni problemi, posebice s uklapanjem gena u koncept centralne biološke dogme. S obzirom na komplikacije, napravljene su i odre ene iznimke, npr. bilo je poznato da odre eni geni ne kodiraju za proteinske produkte, ve za funkcionalne RNA molekule, poput rRNA i tRNA, a isto tako bilo je poznato i RNA podrijetlo genetskog materijala nekih RNA virusa.

1.6. Pregled koncepta gena 1970-ih – 1980-ih godina.

1970-ih godina u molekularnoj biologiji se razvilo sekvenciranje molekule DNA. Prvi sekvencirani gen i genom prvog potpuno sekvenciranog organizma bio je na primjeru bakteriofaga MS2. Sekvenciranje u kombinaciji sa znanjem geneti kog koda dovelo je do novih spoznaja, kao npr. kako su geni organizirani i eksprimirani.

S obzirom na to da je sve ve i broj sekvenciranih gena i genoma, a i paralelan razvoj ra unarne biologije i kompjuterskih metoda, došlo je do razvoja algoritama za identifikaciju gena prema njihovoj sekvenci. Sve ve a koli ina sekvencirane DNA i sve bolja to nost algoritama za predikciju gena stvorila je novu podkategoriju u definiciji gena, a to je **koncept nominalnog gena**, odnosno gena koji se više definira predvi enom sekvencom u genomu, nego kao geneti ki lokus odgovoran za fenotip (Griffiths i Stotz, 2006.).

1.7. Pregled koncepta gena 1990-e – 2000-e

Današnje, najnovije definicije gena nastavljaju se kretati u smjeru gdje je glavna eksperimentalna pozadina za definiciju gena **ra unalna** biologija, odnosno ra unarne metode obrade sekvenciranih genoma. Stoga, postoji nekolicina postavljenih definicija.

Human Genome Nomenclature Organisation definira gen kao “segment DNA koji doprinosi fenotipu ili funkciji. U odsustvu odre enog fenotipa ili funkcije, gen može biti karakteriziran skevencom, transkriptom ili homologijom.” *Sequence Ontology Consortium* definira gen kao “regiju u genomskoj sekvenci koju je mogu e locirati, koja odgovara definiciji gena kao jedinice naslje ivanja, te je povezana s regulatornim regijama, transkribiranim regijama i/ili nekim drugim funkcionalnim regijama u genomu”. *Esemble* u definiciju gena uvrštava i alternativno prikrajanje gena te sve transkripte nastale alternativnim prikrajanjem definira pripadnosti jednom genu.

Razvoj [računalnih](#) metoda omogućio nam je da raspoznamo brojnost i raznolikost elemenata molekule DNA, a koji su bitni za njenu funkcionalnost. U dotadašnjim istraživanjima nije bilo moguće sagledati genom u njegovoj cjelovitosti, te je pomak na sveobuhvatna istraživanja genoma istaknuo mnogobrojnost elemenata DNA koji su bili izostavljeni u dotadašnjem eksperimentalnom radu.

2. Pojmovi koji karakteriziraju gensku aktivnost

Tijekom istraživanja kojima se direktno i indirektno otkrivala biološku definiciju gena izronilo je na površinu nekoliko pojmova i bioloških entiteta koja još od tada pa sve do danas kompliciraju stvaranje jedinstvene definicije gena.

Tokom istraživanja koja su pridonijela poimanju gena provlači se ideja da je gen moguće definirati na jedinstven i jednoznačan način. Jedna od ideja koja je znanstvenicima dugi niz godina predstavljala sigurno tlo za potaknutu rekonstrukciju pojma gen je ideja o njegovoj kontinuiranosti unutar genoma. Istraživanja regulacije genske aktivnosti, kao i otkriće preklapanja, [prekrajavanja](#) i trans-[prekrajavanja](#) uvjerili su nas u suprotno. S današnjeg stajališta gena, koje je objašnjeno u zadnjem dijelu seminara, povijesna definicija i definiranje gena bila su previše robusna i s previše jednostavnim i naivnom upornošću u njegovo definiranje.

2.1. Regulacija aktivnosti gena

Otkrivanje elemenata regulacije aktivnosti gena dovelo je u pitanje pojam gena kao jedinstvenog genetskog lokusa.

Već 1961. godine Francois Jacob i Jacques Monod u svom preglednom radu na temu lac operona (Jacob i Monod, 1961.) u uvodu spominju i uvode distinkciju između pojmova *structural genes* te *regulator and operator genes*. U zaključku rada, dvojac regulatorni aspekt gena karakterizira kao element koji ima utjecaj nad kontrolom stope protoka informacije strukturnih gena do proteina, a bez ikakva upliva u same proteine. Iako u tom radu tek spominju i razvijaju ideju regulacije gena i samih pojmova u definiciji koji ju prati, sličeći problem na temu obuhvaćanja, imenovanja i distinkcije regulatornih elemenata u ideji gena ostaje do danas (Sl. 6).

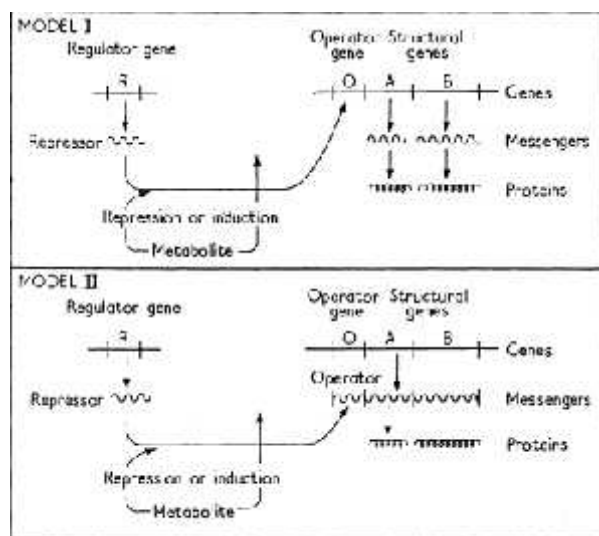


FIG. 6. Models of the regulation of protein synthesis.

Slika 6. Shema kojom su Jacob F. i Monod J. 1961. godine idejno predstavili mehanizme regulacije genske aktivnosti.

U nadolaze im godinama otkrivene su i druge sekvence koje utječu na mnoge aspekte regulacije gena, od transkripcije do degradacije mRNA, pa i post-transkripcijskih modifikacija. Ono što je zakompliciralo dotadašnje objašnjenje gena je otkriće da su određeni elementi koji reguliraju gensku ekspresiju ponekad čak vrlo udaljeni od kodirajuće sekvence za dotični gen. Naime, do tada je u znanstvenom svijetu postojala i bila prihvaćena hipoteza kako je gen jedinstven i kompaktan genetički lokus.

Jedan recentni udžbenik (*Molecular Cell Biology. Section 9.1 Molecular definition of a Gene*, Lodish i suradnici, 2000.) definira gen na idu i na in: "Sa stajališta molekularne biologije, gen je cijela DNA sekvenca potrebna za sintezu funkcionalnog proteina ili RNA molekule. Osim kodirajuće regije (eksona), gen uključuje i regije koje kontroliraju transkripciju, a ponekad i introne."

Ovakvom definicijom, koja bi uključila i regulacijske elemente, treba uzeti u obzir da se mnogi regulatorni elementi, kao i elementi pojačivači (*eng. enhancer*), ne nalaze neposredno uz regiju na koju djeluju, a koja će imati pre-mRNA produkt. Otkrivanjem šarolikosti regulacijskih elemenata unutar genoma i njihove varijabilnosti, te nužnim uvrštavanjem regulatornih elemenata u koncept gena, ideja da je gen jedinstvena sekvenca u genomu nije mogao opstati.

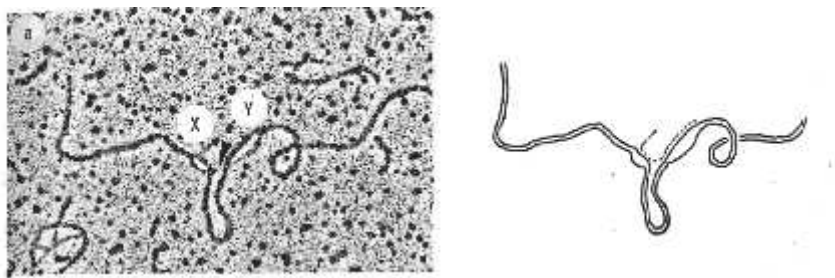
2.2. Preklapanje

Otkrivanjem i mapiranjem kodirajućih sekvenci pojedinih gena, te pregledavanjem dobivenih rezultata, model gena kao jedinica naslijeđa koje su kontinuirane duž DNA je nepreklapajuće "pao u vodu" otkrićem da određeni geni mogu dijeliti zajedničku sekvencu na molekuli DNA.

2.3. Prekrajanje

Iako je pojam kontinuiranosti genetičkog lokusa redefiniran otkrićem elemenata regulacije genske aktivnosti, otkriće prikrajanja je podcrtalo pojam gena kao diskontinuirane jedinice unutar genoma. Naime, nakon uvođenja pojmova intron i ekson, te razotkrivanja mehanizma prekrajanja transkripta i stapanja eksona u funkcionalni produkt, osim što elementi regulacije genske aktivnosti mogu biti odvojeni od same kodirajuće jedinice, pokazalo je da 1 transkript može nastati od isprekidane sekvence DNA.

Proces prikrajanja otkriven je 1977. godine na primjeru adenovirusnog *hexon* gena. Odnosno, u tri rada objavljena iste godine primjećeno je elektronskom mikroskopijom na primjeru istog gena pojavljivanje 5' terminalne domene RNA molekule koja nije bila povezana vodikovim vezama s pripadajućom DNA nakon hibridizacije (Berget i suradnici 1977).



Slika 6. Slika snimljena elektronskim mikroskopom na kojoj je vidljivo stvaranje om e na dijelu DNA koji se nije sparilo s komplementarnom mRNA (Chow i suradnici, 1977).

S tim su otkri ĩma u znanost uvedeni pojmovi introna i eksona, a tako er je I u potpunosti srušena ideja o neprekidnosti i kompaktnosti genetskog lokusa. Kasnije je Walter Gilbert predložio tzv. alternativno prikrajanje gdje razli ite kombinacije eksona mogu biti prekrojene zajedno i mogu dati razli ite izoforme odre enog gena. Do sredine 1980-ih, alternativno prikrajanje je ve ĩlo dokumentirano u nekolicini gena, a procjena gena viših eukariota koji imaju alternativno prikrajanje vrtila se oko 5%. Danas se kombinacijom mRNA-Seq i EST-cDNA podataka ustvrdilo da 95% transkripata multeksonskih gena pokazuje aletrnativno prekrajanje u ljudskom genomu. (Pan i suradnici; 2009.)

U radu *The Sequence of the Human Genome*, 2001. godine gen je definiran nedvosmislenom odrednicom kao lokus kotranskribiranih eksona. S daljnjim objašnjenjem da jedan gen može dati više transkripata, te samim time i nekolicinu razli itih proteina sa nekolicinom razli itih funkcija, s naglaskom na nužnost uzimanja u obzir alternativnog prikrajanja. Pojava alternativnog prikrajanja polako, ali sigurno, uvodi nas u ideju o ve oj bitnosti definiranja funkcionalnosti i elemenata postojanja RNA transkripta sa genoma, nego same sekvence na molekuli DNA.

2.4. Trans – prikrajanje

Trans – prikrajanje ozna ĩava pojavu posebnog oblika procesiranja RNA molekule kod eukariota gdje se eksoni dvaju razli itih primarnih transkripata spajaju i ligiraju. Eksperimentalno je utvr eno postojanje razli itih kombinacija transkripata koji se spoje prije nego budu prikrojeni, transkripti mogu biti s razli itog DNA lanca, pa ĩak i s razli itih kromosoma. Otkri ĩe mehanizma trans – prikrajanja, a i naknadna i sveobuhvatna potkrijepa njegova postojanja te pojavljivanja u genomima mnogih organizama, uzburkala je koncept gena kao lokusa s obzirom na pojavu genskih produkata ĩije su DNA sekvence razdvojene preko cijelog genoma (Gerstein B. Mark, 2007).

Ve spomenuto pravilo “jedan gen – jedan protein” kojeg su skovali Beadle i Tatum bilo je fundamentalno za molekularnu biologiju. To pravilo je podcrtavalo mnoga istraŹivanja, kao što je i usmjeravalo iŹ ekivanja brojnih eksperimenata. Otkri ĩe trans – prikrajanja, ali i *tandem Chimerism-a* potkopalo je tu, do tada bitnu, premisu molekularne biologije. Ovim otkri ĩma je spoznato da ograni en broj gena može potencijalno kodirati za mnogo ve ĩ broj proteina.

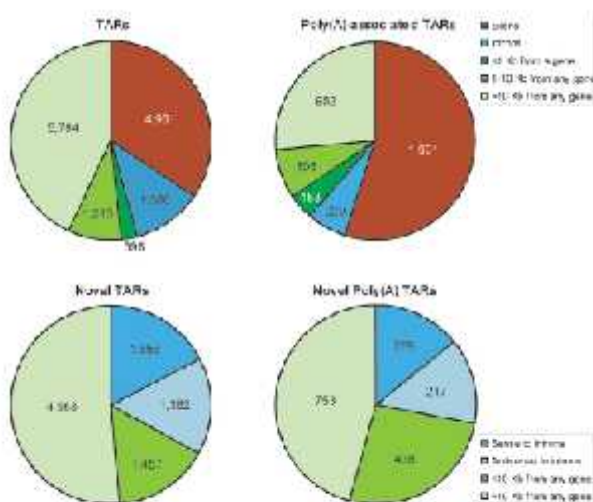
Naime, *tandem chimerism* je pojava kada su dva uzastopna gena transkribirana u jednu molekulu RNA. Translacija nakon splicinga takve RNA molekule može proizvesti novi, fuzionirani protein, koji ima dijelove od oba originalna proteina.

3. Doprinosi projekta [ENCODE](#) definiranju gena

The National Human Genome Research Institute (NHGRI) u rujnu 2003. je pokrenuo projekt ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) kojem je cilj bio ustvrditi sve funkcionalne elemente u sekvenci ljudskog genoma. Našu upu enost u bogatstvo i raznolikost elemenata genoma dodatno su zakomplicirali rezultati ovog projekta. Naime, sveobuhvatna analiza na razini cijelog genoma predstavila je neke zaključke koji pokazuju složenost genoma u većim detaljima, a koji u dotadašnjim eksperimentalnim rezultatima nisu bili vidljivi. Pregled zaključaka i rezultata iznesen je u ovom poglavlju.

3.1. Transkripti koji prethodno nisu anotirani

Među u prvim otkrićima ima konzorcija [ENCODE](#) je neotkriveno velika količina molekule DNA koja se u ljudskom genomu prepisuje, a u istraživanjima provedenim do objave istraživanja *Global Identification of Human Transcribed Sequences with Genome Tiling Arrays* 2004. godine nije bila poznata. Ove novootkrivene regije DNA koje se prepisuju nazivaju se TAR-ovi, odnosno transkripcijski aktivne regije. Istraživači u radu pohvaljuju metodu koja im je omogućila sveobuhvatno istražiti kompletni set regija u genomu koje kodiraju za RNA bilo koje vrste. Rezultati koje su dobili razotkrivaju 10585 novih transkribiranih sekvenci unutar genoma. Visok stupanj [o uvanosti](#) između novootkrivenih TAR-ova i dobro okarakteriziranih proteina miša daju naznaku da bi veliki dio TAR-ova mogao kodirati za funkcionalne transkripte (Sl. 7). Mnoge od [o uvanih](#) sekvenci su lokalizirane u regijama udaljenim od dosad poznatih gena, a spomena vrijedne frakcije ovakvih sekvenci su dovoljno dugačke da kodiraju proteine dugačke 300 ili više aminokiselina. Ostali TAR-ovi mogli bi kodirati za male proteine i RNA molekule još nepoznate funkcije (Berton i suradnici, 2004).



Slika 7. Distribucija TAR-ova u usporedbi s dosad anotiranim genima. (Bertone i suradnici; 2004.)

Ovakva i sli na istraživanja provedena u godinama nakon svakako su nam ukazala na to koliko simplificirano poznajemo funkcionalnost, distribuciju i me uodnos pojedinih genomskih elemenata. Tako er, s dolaskom novih metoda i trendova, u molekularnoj biologiji još jednom je potvr ena kompleksnost genoma, njegovih elemenata, ali i vrlo živopisna upitnost prave naravi gena.

3.2. Neanotirani i alternativni TSS-ovi

[Projekt ENCODE](#) je tako er u svojim rezultatima utvrdio velik broj dotad neotkrivenih TSS-ova (*Transcription Start Site*), tj. mjesta u genomu koja ozna avaju po etak transkripcije. Od novootkrivenih TSS-ova mnoga imaju svojstva ve poznatih TSS-ova. Ta svojstva uklju uju strukturu kromatina i sekvence na kojima se vežu DNA vezni proteini, a koje su nam ve poznate iz prakse.

3.3. Raspodjela regulacijskih elemenata u genomu

U rezultatima ENCODE projekta obra ena je pozornost i na regulacijske elemente gena. U tom istraživanju, a i u svim kasnijim istraživanjima koja uklju uju bioinformatiku obradu podataka, donesen je op i zaključak u kojem se izražava briga oko slabog poznavanja regulatornih elemenata i njihovom potencijalnom pojednostavljivanju sa pokušajem da ih se ugura u jednostavni model gena.

Regulatorne regije jednog gena nisu nužno locirane neposredno uzvodno do doti nog gena, ve mogu biti podosta udaljene na genomu, pa ak mogu biti i bliže nekom drugom genu. Tako er, pojedini geni mogu koristiti više promotora i pojavu grupiranja odre enih promotora (Kim i suradnici, 2005.).

Vezna mjesta transkripcijskih faktora protežu se itavim genomom, ali, suprotno o ekivanju, nisu nasumi no posložena unutar genoma ve su organizirana u više i manje bogate regije. Istraživanje rasprostranjenosti transkripcijskih regulatornih elemenata unutar ENCODE regija ljudskog genoma donosi ideju o transkripcijski bogatim *otocima* i transkripcijski siromašnim *pustinjama*. Pustinje se podudaraju s lokacijama u genomu s malom gusto om gena, dok se otoci podudaraju s lokacijama u genomu sa velikom gusto om gena (Sl. 8; Zhang i suradnici, 2007.).



Slika 8. Vizualni prikaz regulatorno bogatih otoka i regulatorno siromašnih pustinja

Otkriveno je da poneki regulatorni elementi mogu i sami biti prepisani, što se kosi s konvencionalnim modelom gena, u kojem se DNA elementi koji reguliraju ekspresiju gena ne prepisuju i sami po sebi nisu dio transkriptoma. Projekt ENCODE i druga istraživanja osigurala su nam dokaze na razini genoma da je konvencionalni model gena prejednostavan, te da regulatorne regije pojedinih gena mogu postojati unutar prvog eksona, introna ili negdje duž cijele sekvence odre enog gena.

3.4. Pseudogeni

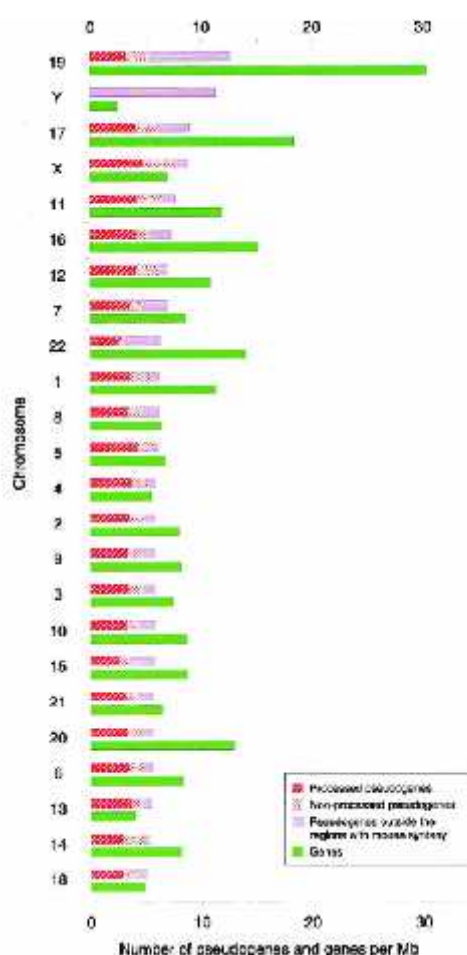
Prilikom definiranja gena u obzir treba uzeti i pseudogene. Ponajviše zbog toga što postojanje pseudogena dodatno komplicira preciziranje strukture i položaja gena.

Zastarjela definicija pseudogena glasi da su oni cjelovite i djelomi ne kopije gena koje nisu u mogu nosti kodirati za funkcionalni polipeptid. Postoje dva tipa pseudogena koja nastaju odvojenim mehanizmima. “Neprocesirani” pseudogeni nastaju nakon djelomi ne ili cjelovite duplikacije gena te naknadnog gubitka funkcije dupliciranog dijela (ili itavog gena). “Procesirani” pseudogeni nastaju retrotranspozicijom zrele mRNA. Oni se ugra uju nasumi no u genom i zbog toga im nedostaje uzvodni promotor. Zbog preuranjena zaustavljanja reverzne transkripcije,

mnogi procesirani pseudogeni sadrže djelomično kodiraju u regiju ili ju uopće ne sadrže.

Kad su u pitanju pseudogeni i naša potreba da ih smjestimo ili bar izdvojimo negdje unutar definicije gena, potrebno je prvo prilagoditi definiciju pseudogena s obzirom na otkrića vezana uz njih. Otkriće i detaljna analiza NOS pseudogena (eng. *nitric oxide synthase*) u centralnom živčanom sustavu *Lymnaea stagnalis* pokrenula je i daljnje utvrđivanje i nagađanje funkcije transkripta sa zaključkom o potencijalnoj novoj klasi regulatornih gena živčanog sustava (Korneev, 1999). Osim na ovom, aktivna transkripcija pseudogena otkrivena je na brojnim drugim primjerima. Također, otkrivena je RNA pseudogena koja je sa susjednim genom tvorila gen-pseudogen kimerni transkript. Osim aktivnosti, postoje dokazi da pseudogeni mogu biti uključeni u regulaciju ekspresije gena (Balkariev, 2003).

U ljudskom genomu otkriveno je približno 20,000 pseudogena. 72% identificiranih pseudogena je nastalo retrotranspozicijom, a 28% segmentalnom duplikacijom. (Torrents I suradnici, 2003.) Slika 9. predstavlja vizualni prikaz raspodjele pseudogena po ljudskim kromosomima.



Slika 9. Pseudogeni u humanom genomu

Kao što je već spomenuto u poglavlju *Transkripti koji prethodno nisu anotirani* bioinformatičkim metodama, u genomu je otkriven veliki broj novih TAR-ova. Zbog slabe distinkcije između gena i pseudogena, kao i zbog velike varijabilnosti u funkcionalnosti pseudogena, nužna je njihova preciznija definicija koja će olakšati distinkciju njih i gena. Također, potrebna je identifikacija novih (novootkrivenih) TAR-ova genetičkim i biokemijskim eksperimentima.

3.5. Nekodirajuće molekule [RNA](#)

Centralna uloga RNA molekule u transkripciji bila je poznata još 1950-ih godina. Tada je eksperimentalno bilo poznato da se, iako je molekula DNA smještena u jezgri, sinteza proteina odvija u citoplazmi u prisustvu velikog broja RNA molekula. Kasnije je utvrđeno da su mjesta sinteze proteina ustvari ribosomi. U to je vrijeme rođena hipoteza “jedan gen, jedan protein, jedan ribosom” i hipoteza “centralne dogme”. Ono u čemu su obje hipoteze bile u pravu je uloga mRNA u prenošenju informacije s molekule DNA do ribosoma, ali te su se hipoteze u kasnijem istraživanjima pokazale krivima s otkrićem sve većeg broja specifičnih RNA molekula s posebnim ulogama u stanicama.

Drugu klasu funkcionalnih RNA molekula predvidio je Francis Crick svojom “hipotezom [adapitora](#)”. Crick je predvidio postojanje molekule koja je medijator između tripleta genetičkog koda i aminokiseline. Intuitivnost Crickove predikcije seže u toliku dubinu da je predvidio kako je molekula koja je adaptor - molekula [RNA](#) i da je molekula [RNA](#) za tu funkciju preferentnija od proteina čak i zbog toga što bi njena struktura i kemizam odgovarali njoj, tada predviđenoj funkciji. To je zato jer bi ona sparivanjem baza mogla biti pogodna kao mala, molekula [RNA](#) specifična za prepoznavanje određenog kodona. Mahlon Hoagland i njegov tim potvrdili su Crickovu hipotezu te otkrili i definirali molekule [tRNA](#).

Kasnija istraživanja molekula [RNA](#) dala su nam pregled njihove raznolikosti funkcije, a također i ostavila upitnik na koncept gena kao jedinice koja će kodirati proteine koji doprinose funkcionalnosti stanice i organizma.

Mnoge male molekule [RNA](#) su uridin (U) – bogate RNA molekule koje s proteinima formiraju RNP-ove (ribonukleinske komplekse). Mnogi otkriveni RNP-ovi su kasnije nazvani U1, U2, U4, U5 i U6, te je otkriveno da su komponente *spliceosoma*, koji je uključen u prikrajanje mRNA.

Otkrivena je i uloga RNA molekula u strukturi kromatina. Fundamentalni primjer je ljudska XIST RNA koja ima ulogu u *dosage compensation*-u i inaktivaciji X kromosoma (*dosage compensation* – genetički regulatorni mehanizam koji djeluje na način da izjednačuje ekspresiju gena koji se nalaze na X kromosomu tako da u konačnici budu isti i kod žena XX i kod muškaraca XY).

RNA molekule imaju funkciju i u procesiranju RNA molekula na ribosomima.

Eksperimentalne potvrde su pronašle da bi kod eukariota male jezgrene RNA molekule (snoRNA) mogle biti katalizatori 2'-O-metilacije i pseudouridilacije. Eksperimentalna potvrda tog fenomena dala je naznaku o količini još neotkrivenih

malih jezgrenih RNA molekula. Otkrivanje novih malih jezgrenih RNA molekula vrši se bioinformatičkim metodama i imunoprecipitacijom s antitijelima specifičnim za enzim fibrilarin (metiltransferaza). Pretraga ljudskog genoma za sačuvanim sekundarnim strukturama koje su karakteristične za RNA molekule dala je pretpostavku od oko 30000 strukturnih elemenata u ljudskom genomu koji su pretpostavili postojanje transkripcije RNA molekula, od čega ih se približno 40% podudaralo s eksperimentalnim podacima, tj. s već predviđenim mjestima transkripcije u ljudskom genomu (Washietl i suradnici 2005).

Otkrivene su i RNA molekule (RNAi, eng. *RNA interference*) koje dovode do degradacije komplementarnih mRNA molekula i gubitka specifičnog fenotipa. Smatra se da ove RNA molekule predstavljaju primitivni imunološki sustav protiv RNA virusa i retrotranspozona.

Sve nabrojene RNA molekule i njihova funkcionalnost dočaravaju bogatstvo svoje uloge i važnosti kako u stanici, tako i u organizmu, tokom svih životnih stadija. Otkriće i rasvjetljenje njihove uloge stavilo je naglasak na veću problematiku funkcionalnosti gena nego njegovu nužnu karakterizaciju u kvantitativnom i kvalitativnom pogledu (Eddy, S.R. 2001.).

3.6. Genski i intergenski: postoji li razlika?

U klasičnom konceptu gena jedna od temeljnih zamisli bila je da su geni odvojeni poput vorova na konopu te da se između njih nalazi dio koji ih odvaja, odnosno intergenski dio.

ENCODE je pokazao da je ono što smo do sada smatrali intragenskim dijelom, odnosno dijelom između dva anotirana gena, ustvari transkripcijski aktivno. Transkribirane RNA molekule koje ne kodiraju za proteine i pseudogeni su elementi koji se često nalaze u intragenskom dijelu genoma, a velik broj njih je pozicioniran u intronima protein-kodirajućih gena. Ove komponente unutar introna mogle bi utjecati na ekspresiju njihovih gena direktno, izravno ili neizravno.

4. Zaključak

4.1. ENCODE definicija gena.

S obzirom da je najveći pomak u rješavanju problema definicije gena i svih njegovih svojstava i raznolikosti napravljen tokom ENCODE projekta, a i naknadno na njegovim rezultatima prilažem njihovu definiciju gena kao onu koja najobrazloženije i s najvećom eksperimentalnom pozadinom razmatra gen.

Consortium ENCODE predlaže definiciju gena kao skupa genomskih sekvenci koje kodiraju koherentnu skupinu potencijalno preklapaju ih funkcionalnih produkata. Tijekom postavljanja definicije odredili su nekoliko glavnih stavki koje se moraju pratiti. Gen je genomski sekvencijalni element, DNA i RNA, koji kodira funkcionalne produkte, a to uključuje ili proteine ili RNA molekule. Ako više funkcionalnih produkata dijeli regije koje se preklapaju, u obzir se uzimaju sve preklapajuće genomске sekvence koje za njih kodiraju. Skup sekvenci koje gen mora biti koherentan, što znači da se konačni produkti transkripcije trebaju gledati zasebno, a oni uz to moraju imati preklapajuće dijelove u genomu, s time da svaki od njih ne mora imati sa svakim od njih preklapajućeg dijela.

Deleted: ENCODE consortium

4.2. Zaključak i osobno viđenje problematike

U zadnjih 100 godina izravnog i neizravnog istraživanja znatno se povećala i funkcija gena jednoznačan odgovor na pitanje "Što je gen?" ostaje nepoznat. O širini i količini različitih uticaja biološkog pojma gena govori činjenica da je sa svakim novim korakom znanosti i razvoju novih metoda i tehnika u znanstvenim istraživanjima pojam gena mijenjao svoj smisao.

Koncept gena je tijekom povijesti svojeg definiranja imao konstantnu fluktuaciju između prebacivanja naglaska s njegovih fizičkih na funkcionalne karakteristike. Ono što je definitivno koordiniralo trendovima u znanosti, a time i definicija gena je tehnološki napredak, ali i dostupnost metoda korištenih prilikom istraživanja. Razumom biologijom uvidjeli smo koliko je genom kompleksan i koliko raznolikih segmenata ima. ENCODE projekt je progresivno pomogao u rješavanju prozvanе tematike.

Najmoderniju definiciju gena nudi ENCODE projekt. Naime, u toj definiciji je naglasak stavljen na funkcionalni produkt gena, a ne na sekvencu RNA ili DNA. S obzirom na raznolikost funkcija sekvence DNA (ili RNA, ako je RNA genom) pojam gena kao fizičke vrste jedinice bi mnogo više odgovarala transkriptu s genoma, nego jedinici unutar samog genoma.

U konačnici, iako i preko 100 godina udaljeni od početne definicije gena, znanstveno se vraćamo na sami pojam. Konačna definicija gena ponekad se čini dostupnom i na dohvata ruke, ali ona nikada ne uključuje i sve eksperimentalne rezultate, te bi ovom konstantacijom gen konceptualno i dalje ostao na objašnjenju Wilhelma Johannsenovog, a ta je da je to pojam kojim najlakše možemo objasniti eksperimentalne podatke.

5. Literatura

Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.*

Balakirev, E.S. and Ayala, F.J. 2003. Pseudogenes: Are they “junk” or functional DNA? *Annu. Rev. Genet.* 37: 123–151

Beadle, G.W. and Tatum, E.L. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 27: 499–506.

Benzer, S. 1955. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41: 344–354.

Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. 1977. Spliced segments at the 5 terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3171–3175

Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., Weissman, S., et al. 2004. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306: 2242–2246

Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8.

Eddy, S.R. 2001. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* 2: 919–929.

The ENCODE Project Consortium. 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE

Gersten M. I suradnici; What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition

Griffiths, P.E. and Stotz, K. 2006. Genes in the postgenomic era. *Theor. Med. Bioeth.* 27: 499–521.

Jacob, F. and Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318–356

Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876–880.

Koonin, E.V., Does the central dogma still stand?; 2011.

Korneev, S.A., Park, J.H., and O'Shea, M. 1999. Neuronal expression of

neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene.

McClintock B. I suradnici, A Correlation of Cytological and genetical Crossing-over in Zea Mays, 1931.

Mendel, J.G. 1866. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn 4 Abhandlungen, 3–47

Molecular Cell Biology. Section 9.1 Molecular definition of a Gene, Lodish i suradnici, 2000

Morgan, T.H., Sturtevant, A.H., Muller, H.J., and Bridges, C.B. 1915. The mechanism of Mendelian heredity. Holt Rinehart & Winston, New York

Muller, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. Science

Pan I suradnici; Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing; *Nature Genetics* 40, 1413 - 1415 (2008)

Rogic, S., Mackworth, A.K., and Ouellette, F.B. 2001. Evaluation of gene-finding programs on mammalian sequences. *Genome Res.* 11: 817–832

Torrents, D., Suyama, M., Zdobnov, E., and Bork, P. 2003. A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Res.* 13: 2559–2567

Washietl, S., Pedersen, J.S., Korb, J.O., Stocsits, C., Gruber, A.R., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Reiche, K., Tanzer, A., et al. 2007. Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome. *Genome Res.* (this issue) doi: 10.1101/gr.5650707

Washietl, S., Hofacker, I.L., Lukasser, M., Huttenhofer, A., and Stadler, P.F. 2005. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat. Biotechnol.* 23: 1383–1390.

Zhang, Z.D., Paccanaro, A., Fu, Y., Weissman, S., Weng, Z., Chang, J., Snyder, M., and Gerstein, M.B. 2007. Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome Res.* (this issue) doi: 10.1101/gr.5573107.

6. Sažetak

Koncept gena predložen je prije više od 100 godina. Od trenutka nastanka mijenjao je svoje značenje i implikacije na znanost i društvo. Razvojem metoda u molekularne biologije mijenjali su se pogledi na gen i njegovu funkcionalost unutar živog sustava.

U ovom radu izložen je pregled najvažnijih otkrića koja su definirala gen. Obuhvaćeno je višestruko značenje gena u različitim kontekstima u kojima se spominje tijekom znanstvene povijesti. Krećući se od nasljedne jedinice, jedinice koja daje funkcionalnost organizmu preko produkata transkripcije, do suvremenog bioinformatičkog pogleda na gen, izložen je uvid u složenost genetskih elemenata molekule DNA.

7. Summary

The concept of gene was proposed more than a hundred years ago. From the beginning, it changed its meaning and implications for science and society. The development of molecular biology methods changed the perception of gene and its functionality inside living systems.

In this paper the most important discoveries that defined gene are reviewed. The understanding of genes in different contexts, throughout the history of science, is analyzed. Starting with gene as a unit of heredity, a unit that gives functionality through transcription products, to contemporary bioinformatics gene definition, an insight into the complexity of DNA's genetic elements are presented.